

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Mai 2001 (17.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/34640 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/00

(71) Anmelder und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11020

(72) Erfinder: KIRCHHOFF, Frank [DE/DE]; Schlossgarten
4, 91054 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. November 2000 (08.11.2000)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜNCH, Jan
[DE/DE]; Schlossgarten 4, 91054 Erlangen (DE).
STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Dohmeyers Weg 25,
30625 Hannover (DE). FORSSMANN, Wolf-Georg IPF
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE). ADERMANN, Knut IPF
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 53 732.1 8. November 1999 (08.11.1999) DE
100 23 665.0 16. Mai 2000 (16.05.2000) DE

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22
41, 50462 Köln (DE).

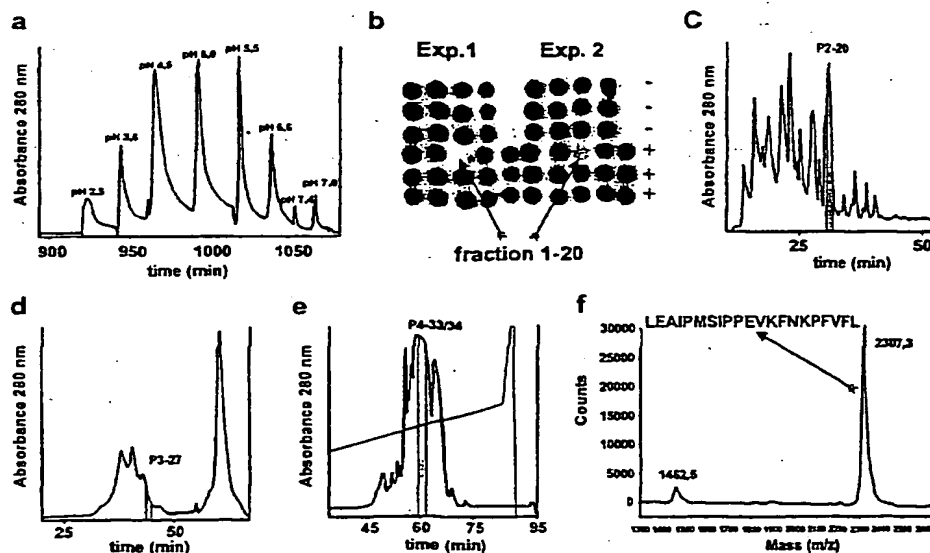
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): IPF PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE];
Feodor-Lynen-Str. 31, 30625 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDE (VIRIP) WHICH INHIBITS A CIRCULATING VIRUS IN HUMANS AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: HUMANES ZIRKULIERENDES VIRUS INHIBIERENDES PEPTID (VIRIP) UND SEINE VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to a peptide with the following amino acid sequence: Z₁-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z₂ (VIRIP), in addition to its biologically active fragments and/or variants and/or derivatives, in particular, amidated, acetylated, sulphated, polyethylene glycol (PEG) modified, phosphorylated and/or glycosylated derivatives and to peptides which can be prepared by multiple synthesis and which have the biological activity of VIRIP. In said sequence, Z₁ and Z₂ represent independently of one another a number of amino acid esters between 0 and 10 and if Z₁ or Z₂=0 amino acid esters, then Z₁=H and/or Z₂=COOH.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/34640 A2



CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Peptid mit nachfolgender Aminosäuresequenz: Z₁-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z₂ (VIRIP), sowie seine biologisch aktiven Fragmente und/oder Varianten und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, Polyethylenglycol (PEG) modifizierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von VIRIP besitzen, darin repräsentieren Z₁, Z₂ unabhängig voneinander eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten, und falls Z₁ oder Z₂=0 Aminosäurereste bedeuten, dann Z₁=H und/oder Z₂=COOH.

Humanes zirkulierendes Virus inhibierendes Peptid (VIRIP) und seine Verwendung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid (Eiweißstoff) mit inhibierenden Eigenschaften auf die virale Infektion von Zellen: Humanes Virus inhibierendes Peptid (VIRIP) und seine therapeutische und diagnostische Verwendung. Die Erfindung umfasst die natürlich vorkommende Form des VIRIP sowie abgeleitete Fragmente und/oder Analoga bzw. Derivate sowie schließlich ein Arzneimittel enthaltend die natürlichen, rekombinanten und synthetischen Peptide zur Verwendung für medizinische Indikationen und zur Verwendung als ein Diagnosemittel. Die Erfindung umfasst darüber hinaus modifizierte Formen des VIRIP, die eine besonders günstige therapeutische Wirksamkeit aufweisen. Des weiteren eine Nukleinsäuresonde hybridisierend für VIRIP oder eines seiner Fragmente und/oder Derivate und Antikörper bzw. Antagonisten gerichtet gegen VIRIP oder eines seiner Fragmente und/oder Derivate zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken, insbesondere bei viralen Erkrankungen und zur Behandlung von Infektionen mit HIV-1 und HIV-2.

Die VIRIP konnte überraschenderweise mit Hilfe von chromatographischen Methoden und mit Hilfe eines biologischen Assays aus humanem Hämofiltrat isoliert werden. Die biochemische Charakterisierung des erfindungsgemäßen Peptids erfolgte durch Massenspektrometrie und vollständigen Sequenzierung aller Aminosäuren.

Das Peptid besitzt die folgende Aminosäuresequenz:

Z_1 - LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF - Z_2 , worin Z_1 , Z_2 unabhängig voneinander eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten, und falls Z_1 oder $Z_2=0$ Aminosäurereste bedeutet, dann $Z_1=H$ und/oder $Z_2=COOH$ repräsentieren.

Die Molekularmasse des erfindungsgemäßen Peptids VIRIP beträgt 2303 Da, wenn Z_1 und Z_2 keine Aminosäurereste bedeuten.

Als Derivate des VIRIP sind insbesondere amidierter, acetylierter, sulfatierter, Polyethylenglycol (PEG) modifizierter, phosphorylierter und/oder glykosylierter Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von VIRIP besitzen, zu nennen.

Das erfindungsgemäße Peptid umfasst ein 20 Aminosäuren umfassendes Fragment des bekannten humanen Proteins Alpha-1-Antitrypsin (Accession No. P01009), welches in seiner prozessierten Form aus 394 Aminosäuren besteht. Die Funktion des Alpha-1-Antitrypsin wird vornehmlich als Hemmstoff für die Enzyme Elastase sowie Thrombin und Plasmin beschrieben. Die erfindungsgemäße Peptidsequenz des VIRIP beginnt vorzugsweise hinter der Aminosäure 352 des Alpha-1-Antitrypsin und umfasst somit die Aminosäuren 353 bis 372 des Alpha-1-Antitrypsin.

Überraschenderweise bewirkt das erfindungsgemäße Peptid eine Unterdrückung der HIV-1-Infektion und/oder -Replikation von bzw. in humanen Blutzellen.

Das erfindungsgemäße Peptid ist durch ein Reinigungsverfahren ausgehend von humanem Hämofiltrat erhältlich. Dieses Hämofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an.

Gegenstand der Erfindung sind auch Polynukleotide, die für das erfindungsgemäße Peptid kodieren, wobei diese Polynukleotide bevorzugt aus DNA-RNA genomischer DNA oder PNA aufgebaut sind. Ein weiterer Aspekt der Erfindung

sind Vektoren, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten sowie gentechnisch manipulierte Wirtszellen, die den erfindungsgemäßen Vektor enthalten. Auch Polynukleotide, die mit den erfindungsgemäßen Polynukleotiden hybridisieren (Antisense-Nukleotide) sind Gegenstand der Erfindung. Weitere Aspekte der Erfindung sind Antikörper, die gegen die erfindungsgemäßen Peptide gerichtet sind sowie Antagonisten und Inhibitoren, die die Wirkung der erfindungsgemäßen Peptide hemmen.

Das erfindungsgemäße Peptid kann auch mit einem Adapterprotein gekoppelt sein, das die Aufnahme in virusinfizierbare Zellen gewährleistet.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Behandlung von Patienten, die VIRIP benötigen durch Gabe therapeutischer Mengen der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie Verfahren zur Behandlung von Patienten, die eine Inhibition des VIRIP benötigen durch Gabe therapeutischer Mengen eines Antagonisten/Inhibitors.

Alternativ kann die therapeutische Wirkung des erfindungsgemäßen Polypeptides durch Gabe von Polynukleotiden kodierend für VIRIP und anschließende Expression in vivo beim Patienten erreicht werden.

Das humane Hämofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1,5 bis 3,5, insbesondere 2,5 bis 3,0. Danach wird das Hämofiltrat über einen Kationenaustauscher geleitet, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierenden Trägermaterial (Fraktogel SP - 650 (M), Merck, Darmstadt). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit einer relativ hoch konzentrierten Salzlösung eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0,5 bis 1 molaren Ammoniumacetatlösung.

Das aufgefangene Eluat wird einer weiteren Kationenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Stufenelution mit Puffern von ansteigenden pH-Werten.

Die das erfindungsgemäße Peptid enthaltenen Fraktionen werden mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie und nachfolgender semipräparativer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Der Aufreinigungsgrad wird vorzugsweise mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien überprüft.

Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturaufklärung zugeführt. Die Bestimmung der Molekülmassen des gereinigten Peptids erfolgte mittels eines Elektrospray Massenspektrometers (ESI-MS). Die Sequenzanalyse des nativen Peptids erfolgte über einen Edman-Abbau mit einem ABI 473 A Sequenzer. Die erfindungsgemäße Peptidsequenz wurde chemisch synthetisiert und die Struktur des synthetisch hergestellten Peptids wurde ebenfalls aufgeklärt. Dieses synthetisch hergestellte VIRIP bewirkt ebenfalls eine dosis-abhängige Unterdrückung der HIV-1-Infektion und/oder -Replikation von bzw. in humanen Blutzellen.

Das erfindungsgemäße Peptid sowie seine cDNA, sein Gen und Analoga, Fragmente und Derivate zu dem Peptid, der cDNA und dem Gen sowie Antikörper, welche die Wirkung des VIRIP aufheben, können als Arzneimittel Verwendung finden. Seine biologische Aktivität entspricht der virus-inhibierender Substanzen. Dabei kann vermutet werden, dass VIRIP aufgrund seiner kurzen, hydrophoben Sequenz in die Blutzellen aufgenommen wird und dort als Hemmstoff von Virus-Enzymen oder als Hemmstoff von Enzymen der Blutzellen wirkt oder dass VIRIP an Rezeptoren bindet, welche für den Eintritt von Viren von Bedeutung sind. Somit verhindert VIRIP die Infektion von Zellen mit dem Virus.

Das erfindungsgemäße Peptid kann dabei in für Peptide üblicher Weise parental, intravenös, intramuskulär, intranasal, lokal-topisch, subkutan oder bukal verabreicht werden. Die Menge an zu verabreichendem Peptid beträgt 1 mg bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag. Die Wirkung des erfindungsgemäßen

Peptids kann durch Gabe geeigneter Inhibitoren/Antagonisten gehemmt werden.

Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid gegebenenfalls in fluoreszenz- oder radioaktiv-markierter Form, um in einem an sich bekannten ELISA oder RIA eingesetzt zu werden. Die Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Peptid können durch Immunisierung von Säugetieren erhalten werden. Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält DNA, RNA und/oder PNA gegebenenfalls in modifizierter und/oder markierter Form zum Einsatz in dem Fachmann bekannten Testsystemen wie PCR oder Fingerprinting.

Figur 1: Aufreinigung von VIRIP. Die Aufreinigungsschritte sind im Text beschrieben. (b) Inhibition der Replikation von HIV-1 NL43 in humanen Blutlymphozyten durch die Fraktion 1-20. Die Zellen wurden 2 Tage mit PHA stimuliert, mit Virusstocks die 10 ng p24 enthalten infiziert und die Reverse Transkriptase-Aktivität im Kulturüberstand 9 Tage nach Infektion bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis der Infektionsexperimente.

Figur 2: Einfluss von synthethischem VIRIP auf die Infektion von CEMx174-SEAP Indikatorzellen (links) und die Replikation in humanen PBMCs (rechts). Die Zellen wurden in Gegenwart der aufgeführten Mengen an VIRIP infiziert und kultiviert. Zur Bestimmung des viralen Eintritts wurde die Aktivität der sekretierten Alkalinen Phosphatase in Kulturüberstand der CEMx174-SEAP Zellen drei Tage nach der Infektion bestimmt.

Figur 3: Die V3-Schleife des X4-tropen NL43 Klon wurde gegen die entsprechenden Sequenzen der dargestellten HIV-1 Isolate ausgetauscht. Die rekombinanten Viren unterscheiden sich somit ausschließlich in der V3-Schleife. Im rechten Panel ist der beobachtete inhibitorische Effekt (%), die Gesamtladung der V3-Region und der Korezeptortropismus dargestellt.

Figur 4: Dosis-abhängige Hemmung der X4-tropen P59S und der R5-tropen 92TH HIV-1 NL4-3 Rekombinanten durch VIRIP. P4R5

Indikatorzellen wurden in Gegenwart der dargestellten Konzentrationen an VIRIP infiziert und die β -Galaktosidase-Aktivität im Zellextrakt 2 Tage nach Infektion gemessen.

Figur 5: VIRIP hemmt die Vermehrung verschiedener HIV-Isolate mit unterschiedlichem Zell- und Korezeptor-Tropismus in humanen PBMC. Vorstimulierte PBMC wurden in Gegenwart der dargestellten VIRIP Konzentrationen mit den diversen HIV-1 Isolaten (10 ng p27 antigen) oder einem chimären Onko-Lentivirus (Mu-HIV). Die Virusvermehrung wurde durch die Messung der Reverse Transkriptase-Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1

Isolierung des antiviral wirksamen VIRIP

1. Schritt: Hämofiltrat-Batch-Extraktion

800-1000 L Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH -Wert von 2.7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm verdünnt und mit einer Flussrate von 3 L/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten)
Säulenmaterial:	Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
Fluss:	3 L/min
Detektion:	280 nm, pH, Leitfähigkeit
Puffer A:	Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
Puffer B:	0.5 M Ammoniumacetat

Anlage: Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Bio systems, Wiesbaden)

Nach Auftrag der insgesamt 1.000 L Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0.5 M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6.8 - 7.2) und steigende Leitfähigkeit (56 mS/cm) in etwa 5 L Eluat erreicht.

2. Schritt: Erste präparative Auftrennung (Charge 01/1998)

Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in einer Menge von 10.000 L Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf 2.7 wird das Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage 250 VA
Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
Fluss: bis zu 3 L/min während des Auftrages
0.5 bis 1 L während der Elution
Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
Probe: Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
Anlage: Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Bio systems, Wiesbaden)

Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0.01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffern

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Leitfähigkeit (mS/cm)
Waschpuffer:	2.0	0.01 M HCl	1

8

Elutionspuffer 1:	3.6	0.1 M Zitronensäure-1-hydrat	2.9
Elutionspuffer 2:	4.5	0.1 M Essigsäure + 0.1 M Natriumacetat	4.0
Elutionspuffer 3:	5.0	0.1 M Äpfelsäure	6.2
Elutionspuffer 4:	5.6	0.1 M Bernsteinsäure	6.1
Elutionspuffer 5:	6.6	0.1 M NaH ₂ PO ₄	4.9
Elutionspuffer 6:	7.4	0.1 M NaH ₂ PO ₄	6.7
Elutionspuffer 7:	9.0	0.1 M Ammoniumcarbonat	6.7

Die Eluate 1-7 werden als pH-Pool I-VII bezeichnet (s. Fig. 1a). Sie werden separat gesammelt und abschließend mit VE-Wasser gespült. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer neuen Basislinie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 L erreicht werden.

3. Schritt: Zweite präparative Auftrennung:

Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reversed Phase Chromatographie getrennt

Chromatographiebedingungen:

Säule:	FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
Säulenmaterial:	Source RPC, 15 µm 10 x 12.5 cm (FineLine 100)
Fluss:	150 mL/min (FineLine 100)
Detektion:	280 nm, Leitfähigkeit, pH
Puffer A:	10 mM HCl
Puffer B:	80% Acetonitril in 10 mM HCl
Gradient:	0-60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

Nach Auftrag der einzelnen pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Aliquots der entstandenen

Fraktionen werden im Bioassay getestet. Die Fraktion 20 aus pH-Pool I enthielt das erfindungsgemäße Peptid (s. Fig. 1b, c).

4. Schritt: Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Insgesamt 500 mg der im Assay bioaktiven Fraktion 20 aus pH-Pool I wurden über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktion 27 enthielt die erfindungsgemäße Substanz (s. Fig. 1d).

Chromatographiebedingungen:

Säule:	4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Vydac RP-C18 15-20 µm, 300 Å
Puffer A:	30% Methanol, 70% Wasser, 0.1% TFA
Puffer B:	100% Methanol, 0.1% TFA
Gradient:	0 - 60% B in 2100 ml
Fluss:	40 ml/min
Detektion:	214 nm und 280 nm
Chromatographieranlage:	BioCad 250, Perseptive Biosystems
Fraktionen:	à 50 ml ab Start des Gradienten

5. Schritt: Analytische Reverse-Phase C4-Chromatographie:

Die bioaktive Fraktion 27 aus der vorhergehenden Chromatographie wurde über eine analytische Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Aliquots wurden im Bioassay getestet. Die Fraktionen 33+34 enthielten die erfindungsgemäße Substanz in aufgereinigter Form.

Chromatographiebedingungen: 5 µm, 100 Å, 20 x 250 mm;

Säule:	2 cm x 25 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	RP-C4, 5 µm, 100 Å, Biotek Silica, Östringen,

Germany

Puffer A: Wasser, 0.1 % TFA
Puffer B: 80 % Acetonitril, 20% Wasser, 0.1 % TFA,
Gradient: 20 - 60% B in 80 min, 60 - 100% B in 2 min
Fluss: 8 ml/min
Detektion: 214 nm und 280 nm
Chromatographieanlage: Kontron
Fraktionen: á 1.5 min ab Start des Gradienten

Die erfindungsgemäße Reinsubstanz wurde daraufhin in dosisabhängiger Weise im Bioassay untersucht und peptidchemisch charakterisiert.

Beispiel 2

Massenbestimmungen

Die Massenbestimmungen des aus Hämofiltrat isolierten Peptids (aus den Fraktionen 33+34 des 5. Schritts in Beispiel 1) und des chemisch synthetisierten Peptids (Beispiel 3) wurden auf einem ESI Massenspektrometer durchgeführt (s. Fig. 1f). Die Molekülmasse der Peptide wurden entsprechend der nachfolgend gezeigten Massenzahlen (MW) bestimmt:

VIRIP, isoliert aus humanem Hämofiltrat: 2303 Da

VIRIP, chemisch synthetisiertes Peptid: 2303 Da

Sequenzbestimmung

Die aufgereinigten nativen und chemisch synthetisierten Peptide werden mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert. Die Proben werden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. Es ergaben sich sowohl für das aus Hämofiltrat isolierte Peptid (aus den Fraktionen 33+34 des

5. Schritts in Beispiel 1) und das chemisch synthetisierte Peptid (Beispiel 3) folgende identische vollständige Aminosäuresequenz:

LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nukleinsäure Datenbanken durchgeführt. Die Peptidsequenz besitzt eine hundertprozentige Identität zu dem aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren 353-372 des humanen Proteins Alpha-1-Antitrypsin (Accession No. P01009).

Beispiel 3

Chemische Synthese von VIRIP

Die chemische Synthese von VIRIP wurde mittels konventioneller Festphasensynthese auf einem Peptid-Synthesizer 9050 unter Verwendung der bekannten Fmoc-Chemie durchgeführt. Das erhaltene Peptid wurde über Reverse-Phase Chromatographie aufgereinigt, seine Identität und Reinheit wurde mittels analytischer RP-HPLC sowie der unter Beispiel 2 beschriebenen Massen- und Sequenzbestimmung festgestellt.

Beispiel 4

Bestimmung der antiviralen Aktivität von VIRIP

Die Isolierung der VIRIP erfolgte aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Vermehrung von HIV-1 in einem Assay, der die Replikation von HIV-1 in peripheren humanen Blutlymphozyten (PBMCs) misst. Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen

gefriergetrocknet und anschließend dem biologischen Assay in Mengen von 10 ml bis zu 1 L Hämofiltrat-Äquivalent zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Aufreinigung unterzogen.

Humane periphere Blutlymphozyten (PBMCs) wurden aus Vollblut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation in Ficoll gewonnen. Die Zellen wurden für zwei Tage vorstimuliert (RPMI-Medium, 20% FKS, 100 U/ml IL-2, 5 µg/ml Phytohämagglutinin [PHA]). Anschließend wurden die PBMCs durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm sedimentiert, in PHA-freiem RPMI-Medium aufgenommen (20% FKS, 100 U/ml IL-2) und in einer Konzentration von etwa 150.000 Zellen pro Loch in 96-Well-Flachboden-Platten in einem Volumen von 80 µl ausgesät.

Am folgenden Tag wurden Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen in Mengen von 10 ml bis zu 1 L Hämofiltrat-Äquivalent zugeführt. Dazu wurden die gefriergetrockneten Chromatographiestufen in Wasser aufgenommen und in verschiedenen Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 10 µl zu den PBMCs pipettiert. Nach 2stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch die Zugabe von 10 µl HIV-1 Virusstock, der 0,1 bis 10 ng p24 Antigen enthält, infiziert. Im folgenden wurden 50 µl des Kulturmediums alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt, welches zusätzlich die korrespondierenden Peptid-Fraktionen enthält. Die Produktion an HIV-Partikeln zu verschiedenen Zeitpunkten (9, 12 und 18 Tage) nach der Infektion der Zellen wurde im Reverse-Transkriptase(RT)-Test quantifiziert. Der RT-Test misst die Aktivität der Reversen-Transkriptase im zellfreien Kulturüberstand und ist somit ein Maß für die Produktion an Viruspartikeln und die virale Vermehrung in den PBMC-Kulturen. Alternativ wurde die Virusproduktion im p24 Antigen-ELISA bestimmt. Fraktionen, die im Vergleich zu Ansätzen ohne potentiell stimulierende oder inhibitorische Peptide zu einer mindestens 90%igen Reduktion der RT-Produktion führten (s. z.B. Fig. 1b) und somit die Vermehrung von HIV-1 in humanen PBMC effizient hemmten, wurden weiter aufgereinigt.

Das aus Hämofiltrat aufgereinigte VIRIP (Beispiel 1) als auch das chemisch synthetisierte VIRIP (Beispiel 3) zeigten eine dosisabhängige Inhibition der HIV-1 Infektion von CEMx174-SEAP Indikatorzellen und der Replikation in PBMCs (Fig. 2). Das erfindungsgemäße VIRIP besitzt dagegen keine zytotoxische Wirkung auf die Blutzellen.

Beispiel 5. Die Effizienz der VIRIP-spezifischen Inhibition ist abhängig von der Sequenz der V3-Schleife im HIV-1 Hüllprotein.

Die Ergebnisse belegten, dass sowohl VIRIP aus Hämofiltrat, als auch das synthetisch hergestellte Peptid die Replikation von HIV-1 NL43 wirksam blockieren. Um herauszufinden, ob VIRIP spezifisch für X4-trope Varianten ist oder auch andere Formen inhibiert, welche den Korezeptor CCR5 benutzen oder dual-trop (X4/R5) sind, wurde eine Reihe von V3-Varianten des molekularen NL4-3 Klon untersucht (Fig. 3). Der V3-Loop des X4-tropen NL4-3 Klon wurde durch die entsprechende Region einer Reihe von primären HIV-1 Isolat ersetzt. Funktionelle Tests mit verschiedenen Indikatorzelllinien zeigten, dass diese V3-Rekombinanten einen unterschiedlichen Zell- und Korezeptor-Tropismus aufweisen. Um den inhibitorischen Einfluss von VIRIP auf diese Varianten zu untersuchen wurden P4R5 Indikatorzellen verwendet. P4R5-Zellen exprimieren sowohl CCR5 als auch CXCR4 und enthalten das Luziferasegen unter der Kontrolle der HIV-1 LTR. Diese Zelllinie wurde in Gegenwart und Abwesenheit von VIRIP mit den diversen rekombinanten Viren infiziert (50 ng p24) und die Infektion mit Hilfe des Luziferasetest quantifiziert. Wie in der Figur 3 dargestellt inhibierte VIRIP sowohl X4-, als auch R5- und X4/R5-trope Varianten. Insgesamt wurden jedoch X4-trope Varianten mit stark positiv geladenem V3-Loop effizienter gehemmt als R5- oder dual-trope Isolate.

Um den inhibitorischen Effekt der erfindungsgemäßen Substanz genauer zu quantifizieren, wurden P4R5 Indikator Zellen in Gegenwart verschiedener Dosen von VIRIP mit dem X4-tropen HIV-1 P59S und dem R5-tropen 92TH Isolat infiziert. Wie in der Fig. 4 dargestellt, inhibierte VIRIP das HIV-1 P59S Isolat

bei einer Konzentration von 40 µg/ml um 50%, und bei einer Konzentration von 180 µg/ml um 90%. Zur Hemmung des X-tropen 92TH Isolates waren etwa 2-fach höhere Konzentrationen an VIRIP erforderlich (Fig. 4).

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass VIRIP die Replikation von X4 - tropen und dual-tropen HIV-Varianten in humanen PBMC bei Konzentrationen von 1000 µg/ml komplett und bei Konzentrationen von 100 µg/ml zumindest partiell unterdrückt (Fig. 5, oben). Die inhibitorischen Effekte auf R5-trope Formen waren geringer. Ein chimäres Onko-Lentivirus (Mu-HIV), welches das MLV-Hüllprotein trägt, wurde nicht inhibiert (Fig. 5, unten).

Patentansprüche

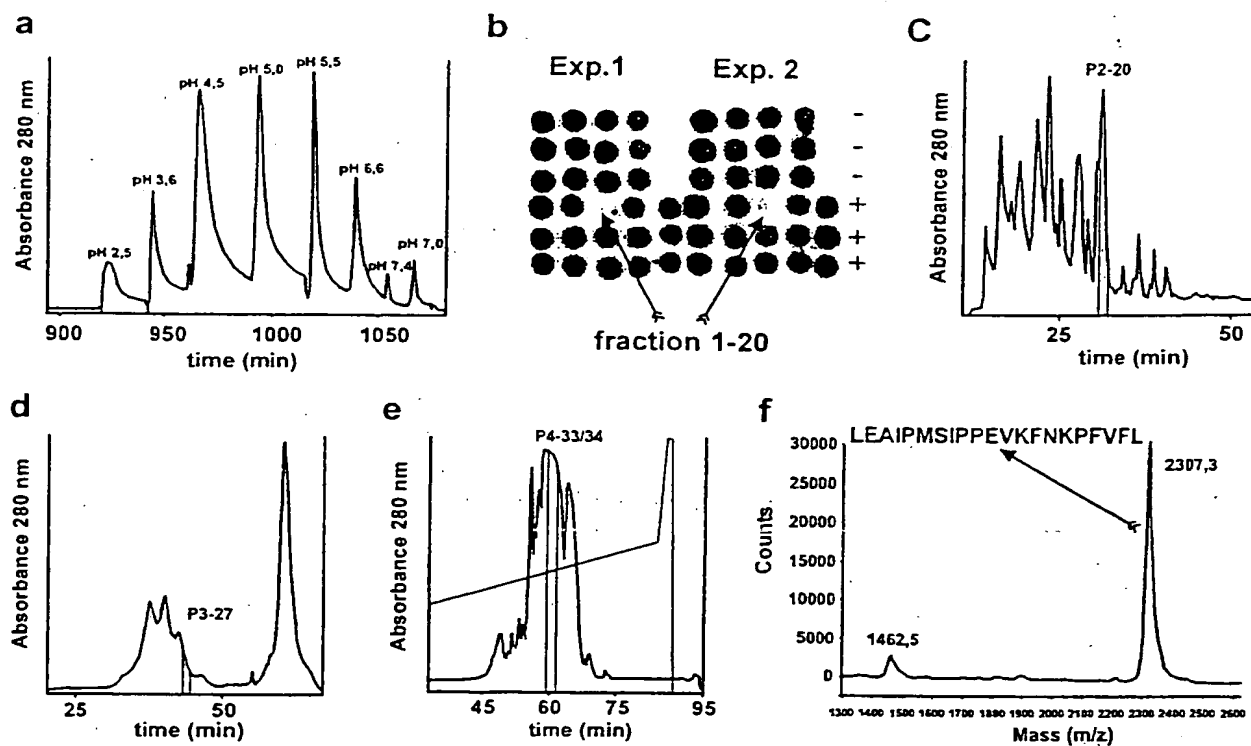
1. Peptid mit nachfolgender Aminosäuresequenz:

^{1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20}
^{21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40}
^{41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60}
^{61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80}
^{81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100}
^{101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120}
^{121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140}
^{141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160}
^{161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180}
^{181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200}
^{201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220}
^{221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240}
^{241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260}
^{261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280}
^{281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300}
^{301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320}
^{321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340}
^{341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360}
^{361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380}
^{381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400}
^{401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420}
^{421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440}
^{441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460}
^{461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480}
^{481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500}
^{501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520}
^{521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540}
^{541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560}
^{561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580}
^{581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600}
^{601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620}
^{621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640}
^{641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660}
^{661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680}
^{681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700}
^{701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720}
^{721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740}
^{741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760}
^{761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780}
^{781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800}
^{801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820}
^{821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840}
^{841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860}
^{861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880}
^{881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900}
^{901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920}
^{921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940}
^{941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960}
^{961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980}
^{981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000}
^{1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020}
^{1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040}
^{1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060}
^{1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080}
^{1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100}
^{1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120}
^{1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140}
^{1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160}
^{1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180}
^{1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200}
^{1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220}
^{1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240}
^{1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260}
^{1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280}
^{1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300}
^{1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320}
^{1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340}
^{1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360}
^{1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380}
^{1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400}
^{1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420}
^{1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440}
^{1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460}
^{1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480}
^{1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500}
^{1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520}
^{1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540}
^{1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560}
^{1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580}
^{1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600}
^{1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620}
^{1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640}
^{1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660}
^{1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680}
^{1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700}
^{1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720}
^{1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740}
^{1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760}
^{1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780}
^{1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800}
^{1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820}
^{1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840}
^{1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860}
^{1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880}
^{1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900}
^{1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920}
^{1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940}
^{1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960}
^{1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980}
^{1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000}
^{2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020}
^{2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040}
^{2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060}
^{2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080}
^{2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100}
^{2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120}
^{2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140}
^{2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160}
^{2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180}
^{2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200}
^{2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220}
^{2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240}
^{2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260}
^{2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280}
^{2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300}
^{2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320}
^{2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340}
^{2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360}
^{2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380}
^{2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400}
^{2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420}
^{2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440}
^{2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2}

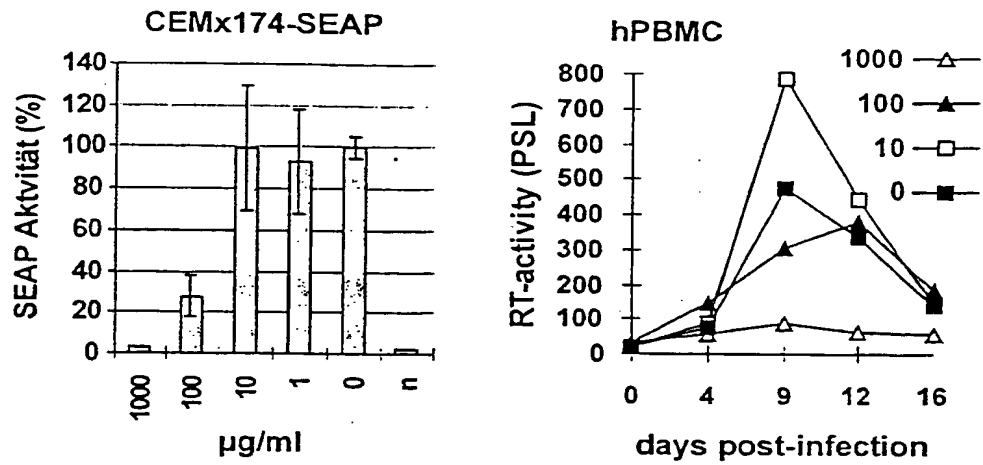
6. Gentechnisch manipulierte Wirtszelle enthaltend den Vektor nach Anspruch 5.
7. Polynukleotide hybridisierend mit einem Polynukleotid aus Anspruch 3.
8. Antikörper gerichtet gegen die Peptide aus Anspruch 1 oder 2.
9. Antagonist/Inhibitor gerichtet gegen die Peptide aus Anspruch 1 oder 2.
10. Peptide aus Anspruch 1 oder 2 in Verbindung mit einem Adapterprotein, das die Aufnahme in Virus-infizierbare Zellen gewährleistet.
11. Galenische Formulierung bestehend aus Peptiden nach Anspruch 1, 2 oder 10 und einem verträglichen Carrier.
12. Verfahren zur Herstellung des Peptides gemäß Anspruch 1 durch Extraktion von Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie.
13. Verfahren zur Herstellung des Peptides gemäß Anspruch 1 oder 2 durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und dessen Aufreinigung.

14. Verfahren zur Herstellung des Peptides gemäß Anspruch 1 oder 2 durch dem Fachmann bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.
15. Diagnostikmittel enthaltend Antikörper nach Anspruch 8 oder enthaltend die Polynukleotide nach Anspruch 3, 4 oder 7.
16. Verwendung des Diagnostikmittels nach Anspruch 15 für Testsysteme zur Kontrolle von Gewebe-, Plasma-, Urin- und Liquor cerebrospinalis-Spiegeln dieser Substanz.
17. Verwendung des Diagnostikmittels nach Anspruch 15 als Marker für virale Erkrankungen, bakterielle und Pilz-Infektionen, inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, Wachstumsstörungen, Erkrankungen des Immunsystems sowie als Marker bei Knochenerkrankungen.
18. Arzneimittel enthaltend die Peptide nach Anspruch 1, 2 und 10 die Polynukleotide nach Anspruch 3, 4 oder 7, die Antikörper nach Anspruch 8, die Antagonisten/Inhibitoren nach Anspruch 9 als wirksamen Bestandteil von galenischen Formen zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, subcutanen, intrathekalen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
19. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 18 zur Behandlung von viralen Erkrankungen, dabei insbesondere HIV-1, HIV-2, Herpes-simplex-Virus, Varicella-Zoster-Virus, Hepatitis-A-, Hepatitis-B-Virus und Hepatitis-C-Virus, Zytomegalie-Virus, Influenza-Virus, Polio-Virus, Rhino-Virus, Röteln-Virus, Masern-Virus, Tollwut-Virus, Rous-Sarcom-Virus, Epstein-Barr-Virus sowie zur Behandlung von bakteriellen und Pilz-Infektionen, entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, Wachstums-

störungen, neuronalen Erkrankungen, Erkrankungen der Blutgerinnung und Blutbildung, Gefäßerkrankungen, Erkrankungen des Immunsystems, sowie zur Wund- und Knochenheilung.



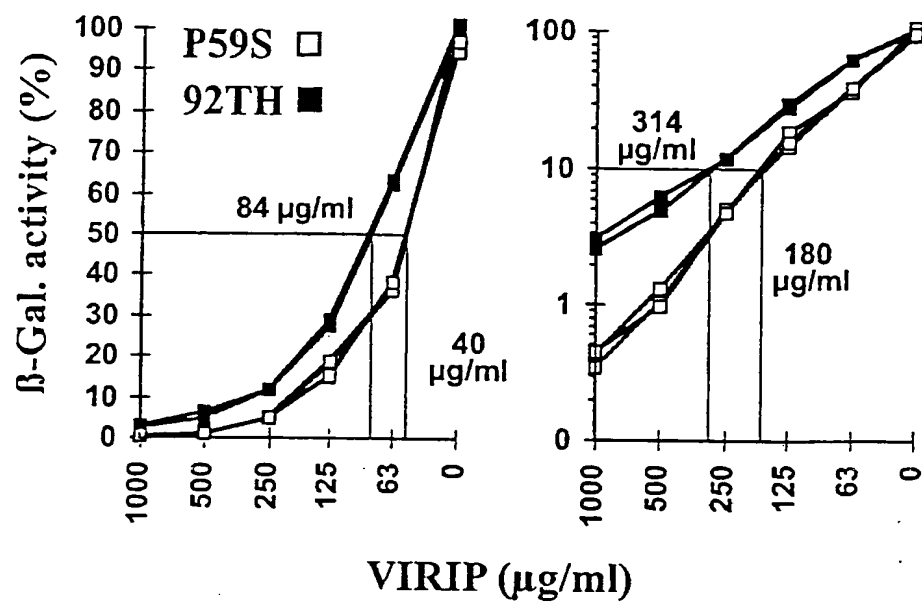
Figur 1



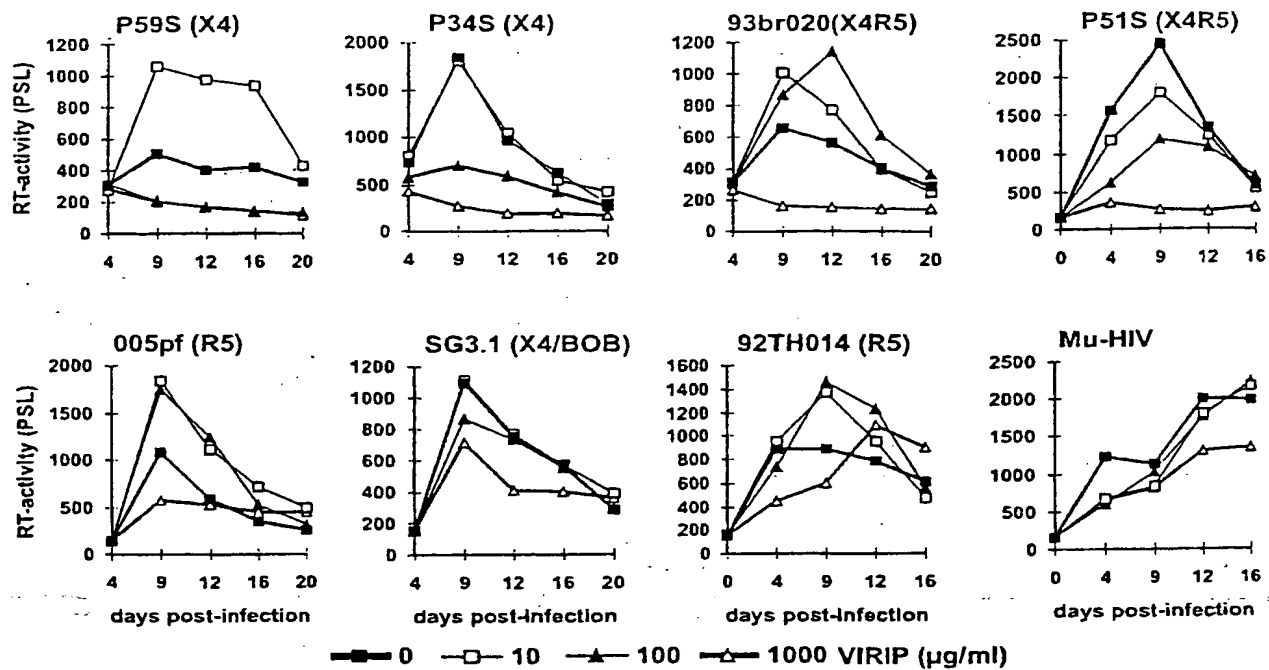
Figur 2

Isolat:	V3-Sequenz	%Inh.	Ldg	Trop.
P59-S/27	---- gspq-r--r- ..-----wlv yargng-----	98	+7	X4
P34-S	---- --his-r-s- ..-----ra -er-.....k ---	91	+8	X4
92ht593-1	---- ----s-r-s- ..-----ra -.k-...-n--- ---90	+7	X4/R5	
HXB2	---- ----r-r- ----v- i-k-...-nm-- ---	90	+9	X4
93br020-17	---- ----r-sl ..-----v--- a-----k ---88	+7	X4/R5	
P51-S	---- g-k--r-ms- ..-----ia -rq-.....k ---	85	+7	X4/R5
92rw020-5	---- ----gvr- ..---q---a --g-.....	78	+5	R5
011jr103	---- ----p- ..----- ..----- ---75	+6	R5	
LAI	---- ----r- ----i-k-...-nm-- ---	70	+8	X4
NL43	---- ----r- ----v- i-k-...-nm-- ---	70	+8	X4
93br025-9	---- ----r- ..---q---a -----58	+5	R5	
YU2	---- ----n- ..-----l- ---- ..----- ---50	+5	R5	
005pf135	---- ----g- ..----- ..----- ---28	+5	R5	
SG3.1	---- -kk---r-tt ..---vy- ----..v----- ---	30	+8	X4/BOB
92th014-12	---- ----l ..-----w-- --q-.....22	+5	R5	
Consensus	CTRP NNNTRKSIHI QRGPGRFYT TGEI..IGDIRQ AHC			

Figur 3



Figur 4



Figur 5

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forssmann, Wolf-Georg
Kirchhoff, Frank

<120> Humanes zirkulierendes Virus inhibirendes Peptid
(VIRIP) und seine Verwendung

<130> VIRIP

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Lys
1				5				10						15	

Pro	Phe	Val	Phe
			20

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Mai 2001 (17.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/34640 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11,
15/12, C07K 7/08, 14/435, C12N 15/62, 15/63, C07K
16/40, 1/14, 1/04, A61K 38/10, 31/7088, 39/395, A61P
31/18

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): IPF PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE];
Feodor-Lynen-Str. 31, 30625 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11020

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: KIRCHHOFF, Frank [DE/DE]; Schlossgarten
4, 91054 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. November 2000 (08.11.2000)

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜNCH, Jan

(25) Einreichungssprache: Deutsch

[DE/DE]; Schlossgarten 4, 91054 Erlangen (DE).
STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Dohmeyers Weg 25,
30625 Hannover (DE). FORSSMANN, Wolf-Georg IPF
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE). ADERMANN, Knut IPF
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.
31, 30625 Hannover (DE).

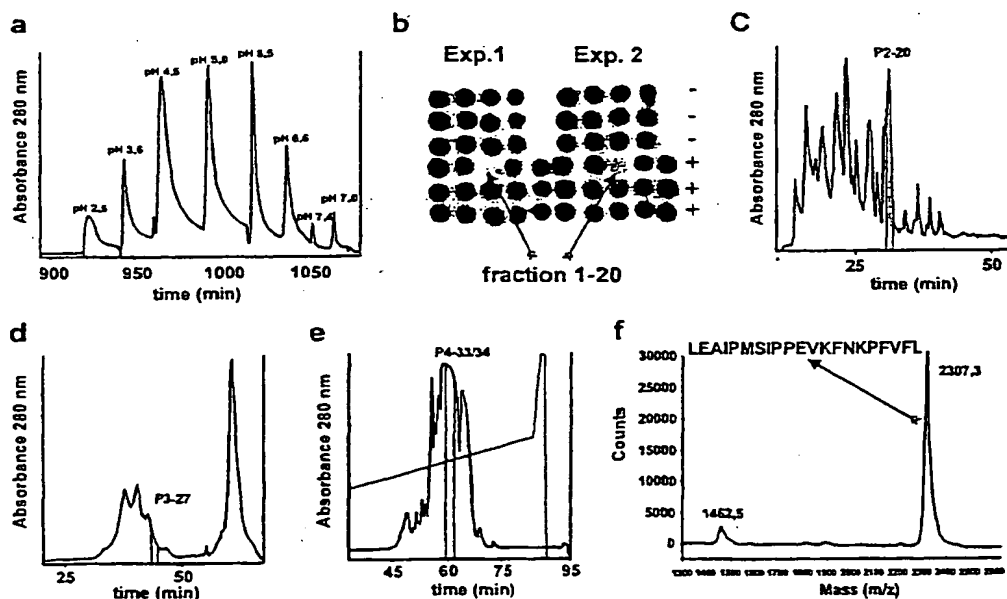
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 53 732.1 8. November 1999 (08.11.1999) DE
100 23 665.0 16. Mai 2000 (16.05.2000) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDE (VIRIP) WHICH INHIBITS A CIRCULATING VIRUS IN HUMANS AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: HUMANES ZIRKULIERENDES VIRUS INHIBIERENDES PEPTID (VIRIP) UND SEINE VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to a peptide with the following amino acid sequence: Z₁-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z₂ (VIRIP), in addition to its biologically active fragments and/or variants and/or derivatives, in particular, amidated, acetylated, sulfated, polyethylene glycol (PEG) modified, phosphorylated and/or glycosylated derivatives and to peptides which can be prepared by multiple synthesis and which have the biological activity of VIRIP. In said sequence, Z₁ and Z₂ represent independently of one another a number of amino acid esters between 0 and 10 and if Z₁ or Z₂=0 amino acid esters, then Z₁=H and/or Z₂=COOH.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/34640 A3



(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.: Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

1. November 2001

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Peptid mit nachfolgender Aminosäuresequenz: Z₁-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z₂ (VIRIP), sowie seine biologisch aktiven Fragmente und/oder Varianten und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, Polyethylenglycol (PEG) modifizierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von VIRIP besitzen, darin repräsentieren Z₁, Z₂ unabhängig voneinander eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten, und falls Z₁ oder Z₂=0 Aminosäurereste bedeuten, dann Z₁=H und/oder Z₂=COOH.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 C12N15/12 C07K7/08 C07K14/435 C12N15/62
C12N15/63 C07K16/40 C07K1/14 C07K1/04 A61K38/10
A61K31/7088 A61K39/395 A61P31/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 46100 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 11 December 1997 (1997-12-11) SEQ ID NO:31	1-8
A	---	10-19
X	WO 84 02918 A (TRANSGENE SA) 2 August 1984 (1984-08-02) page 36, line 6	3-8
X	-& DATABASE GENBANK 'Online! Accession No. A35541, 13 December 1996 (1996-12-13) "H. sapiens alpha-AT1 partial cDNA clone" XP002164956 the whole document	3
A	---	1-8, 10-19
	US 5 420 110 A (MILLER EDWARD J) 30 May 1995 (1995-05-30) column 2, line 20,21 ---	
	--- -/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 April 2001

Date of mailing of the international search report

18.05.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrmann, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 00/11020

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>SHAPIRO LELAND ET AL: "Alpha-1-antitrypsin inhibits human immunodeficiency virus type 1." FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 115-122, XP002164955 ISSN: 0892-6638 the whole document</p>	<p>1-8, 10-19</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00 /11020

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: Claims nos: 9 and in part 18
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See next page

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

Continuation of field I.1

Although the claims nos. 16, 17 and 19 relate to a diagnostic method carried out on the human/animal body, or relate to a method for the treatment of the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

In the broadest sense, claim no. 6 also covers transgenic human beings (and is not restricted to 'non-human' host cell or 'in vitro'). This contravenes the ethics in certain PCT Member States e.g. Article 53(a) of the European Patent Agreement).

Continuation of field I.2

Claims nos: 9 and in part 18

Compounds as such are not sufficiently defined by the details of their effects. A search was not therefore carried out for the subject matter of claims 9 and in part 18 (antagonists/inhibitors), as an antagonist/inhibitor is neither disclosed nor supported by the description according to the terms of PCT Articles 5 and 6.

The applicant is therefore advised that patent claims, or sections of patent claims relating to inventions for which no international search report was drafted, cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination of subject matter, for which no search has been conducted. This is also the case, irrespective of whether the claims are amended following receipt of the international search report (PCT Article 19) or during any PCT Chapter II procedure whereby the applicant submits new patent claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11020

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746100 A	11-12-1997	US 5972901 A	26-10-1999
		AU 720223 B	25-05-2000
		AU 3304497 A	05-01-1998
		EP 1006797 A	14-06-2000
		JP 2000512140 T	19-09-2000
		US 6200801 B	13-03-2001
		US 6072041 A	06-06-2000
WO 8402918 A	02-08-1984	FR 2539758 A	27-07-1984
		FR 2549082 A	18-01-1985
		AT 55150 T	15-08-1990
		CA 1303530 A	16-06-1992
		DE 3482840 D	06-09-1990
		DK 450584 A	20-09-1984
		EP 0114777 A	01-08-1984
US 5420110 A	30-05-1995	JP 60500648 T	09-05-1985
		US 5668107 A	16-09-1997
		CA 2108689 A	19-10-1992
		EP 0616614 A	28-09-1994
		JP 6509327 T	20-10-1994
		WO 9218141 A	29-10-1992

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In .ationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11020

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/11 C12N15/12 C07K7/08 C07K14/435 C12N15/62
 C12N15/63 C07K16/40 C07K1/14 C07K1/04 A61K38/10
 A61K31/7088 A61K39/395 A61P31/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 46100 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) SEQ ID NO:31	1-8
A	---	10-19
X	WO 84 02918 A (TRANSGENE SA) 2. August 1984 (1984-08-02) Seite 36, Zeile 6	3-8
X	-& DATABASE GENBANK 'Online! Accession No. A35541, 13. Dezember 1996 (1996-12-13) "H. sapiens alpha-AT1 partial cDNA clone" XP002164956 das ganze Dokument	3
A	US 5 420 110 A (MILLER EDWARD J) 30. Mai 1995 (1995-05-30) Spalte 2, Zeile 20,21	1-8, 10-19

	---/---	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. April 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. 05. 01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

li nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11020

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>SHAPIRO LELAND ET AL: "Alpha-1-antitrypsin inhibits human immunodeficiency virus type 1." FASEB JOURNAL, Bd. 15, Nr. 1, Januar 2001 (2001-01), Seiten 115-122, XP002164955 ISSN: 0892-6638 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	<p>1-8, 10-19</p>

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☒ Ansprüche Nr. 9 und teilweise Anspruch 18
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
 daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgetordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/SA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 16, 17 und 19 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird oder Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Im weitesten Sinn umfasst Anspruch 6 auch transgene Menschen (nicht auf "nicht-humane" Wirtszelle bzw. "in vitro" beschränkt). Dieser Gegenstand verstößt gegen die guten Sitten in bestimmten PCT-Mitgliedsstaaten (z.B. Art. 53(a) des EPÜ).

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 9 und teilweise Anspruch 18

Verbindungen als solche sind durch die Angabe ihrer Wirkung nicht ausreichend definiert. Daher wurde der Gegenstand des Anspruchs 9 und teilweise des Anspruchs 18 (Antagonisten/Inhibitoren) nicht recherchiert weil ein Antagonist/Inhibitor, im Sinne der Art. 5 und 6 PCT, weder offenbart noch durch die Beschreibung gestützt ist.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II. Nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11020

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9746100 A	11-12-1997	US 5972901 A	26-10-1999
		AU 720223 B	25-05-2000
		AU 3304497 A	05-01-1998
		EP 1006797 A	14-06-2000
		JP 2000512140 T	19-09-2000
		US 6200801 B	13-03-2001
		US 6072041 A	06-06-2000
WO 8402918 A	02-08-1984	FR 2539758 A	27-07-1984
		FR 2549082 A	18-01-1985
		AT 55150 T	15-08-1990
		CA 1303530 A	16-06-1992
		DE 3482840 D	06-09-1990
		DK 450584 A	20-09-1984
		EP 0114777 A	01-08-1984
		JP 60500648 T	09-05-1985
US 5420110 A	30-05-1995	US 5668107 A	16-09-1997
		CA 2108689 A	19-10-1992
		EP 0616614 A	28-09-1994
		JP 6509327 T	20-10-1994
		WO 9218141 A	29-10-1992

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)